

Cellufine™ フォスフェイト HC

セルファイン™ フォスフェイト HC はタンパクキナーゼ、制限酵素、ヌクレアーゼ、ポリメラーゼなどの核酸関連タンパク質などを精製するアフィニティークロマトグラフィー充填剤です。従来のセルファイン™ フォスフェイトと比較して細孔サイズを制御することで分子量の大きな蛋白質の吸着量を向上させました。特に T7 RNA ポリメラーゼなど高分子酵素の精製に有効な次世代のクロマトグラフィー充填剤です。

セルファイン™ フォスフェイト HC は真球状の多孔質セルロース粒子にリン酸エステル基を付加したアフィニティークロマトグラフィー充填剤である。セルロース粒子の 6 位の水酸基にリン酸エステル基を付加した化学構造は核酸に類似の構造となる（図 1）。このため核酸結合タンパク質にアフィニティ活性をもつことが知られている。

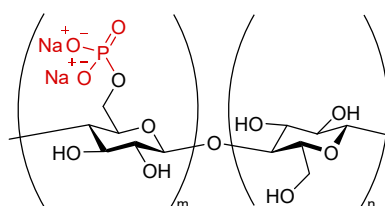
近年、mRNA 薬の台頭によって RNA ポリメラーゼが注目されている。T7 RNA ポリメラーゼ (T7RNAP) は mRNA の合成、すなわち *in vitro* transcription (IVT) RNA 合成に使用されている。T7RNAP は核酸結合タンパク質としての特長を持つためセルファイン™ フォスフェイト HC とアフィニティ活性を持つ。

セルファイン™ フォスフェイト HC はリン酸エステル基を持つ新しいアフィニティークロマトグラフィー充填剤である。従来の充填剤と比べて、細孔サイズを制御することで分子量の大きなタンパク質の吸着量を向上させている（表 1）。特に分子量 45kDa~150kDa の比較的大きな可溶性タンパク質は細孔内部を好適に拡散するため吸着容量が大きい特徴を持つ（図 2）。

表 1 セルファイン™ フォスフェイト HC の特長

	セルファイン™ フォスフェイト	セルファイン™ フォスフェイト HC
リガンド	リン酸エステル基	
ベース担体	セルロース粒子	
粒径 (μm)	40 - 130	
排除限界分子量 (kDa)	30~40	150
イオン交換容量 (meq/mL-gel)	0.3 - 0.8	0.2 - 0.8
リゾチーム吸着量 (mg/mL-gel)	140	-
BSA 吸着量 (mg/mL-gel)	-	100
推奨操作圧力 (MPa)	<0.2	
pH 安定性	5 - 12	
保存方法	2-8 °C in 20 % ethanol	

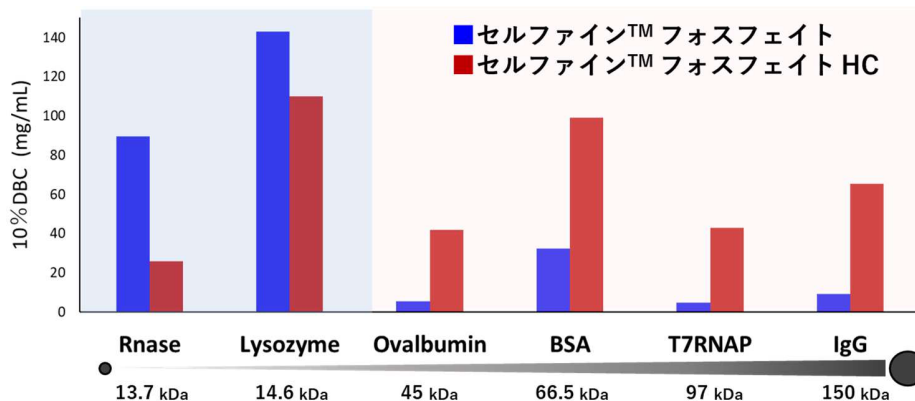
図 1 セルファイン™ フォスフェイト HC の化学構造



セルファイン™ フォスフェイト HC の吸着性能

モデルタンパク質を用いて、セルファイン™ フォスフェイト HC およびセルファイン™ フォスフェイトのタンパク質吸着量を比較した（図2）。

図 2 モデルタンパク質を用いた動的吸着量



セルファイン™ フォスフェイトはリゾチームなど分子量の小さいタンパク質の吸着容量が高い。これは細孔サイズが比較的分子量のタンパク質に最適化されているためである。一方でセルファイン™ フォスフェイト HC は 45kDa 以上のタンパク質の吸着容量が極めて高い。特に mRNA 薬の合成で注目されている T7RNAP の吸着容量は従来製品の 9 倍の性能を持つ。

このように 2 つのフォスフェイト充填剤は、タンパク質の分子量によって使い分けることができる。

その他酵素へのアフィニティ活性

セルファイン™ フォスフェイト HC は T7RNAP だけでなく例えばピロフォスファターゼ（図3）やワクシニアキャッピング酵素（図4）へ強いアフィニティ活性を示す。10 mM リン酸バッファー pH7 でカラムにピロフォスファターゼを吸着させた後、グラジエントで塩化ナトリウム濃度を上げていき、カラムから溶出してくる際の電気伝導度を測定した（図3）。溶出ピーク時の電気伝導度は 74.5mS/cm (0.9 M NaCl 相当) となり、強い吸着性が示された。またワクシニアキャッピング酵

素では 50mS/cm で溶出ピークが極大となった（図4）。

このような塩濃度では静電的相互作用で吸着する夾雑タンパク質はカラム内に残存しない。このためアフィニティ活性を持つ酵素群を効果的に精製することができる。

図 3 ピロフォスファターゼ溶出時の電気伝導度

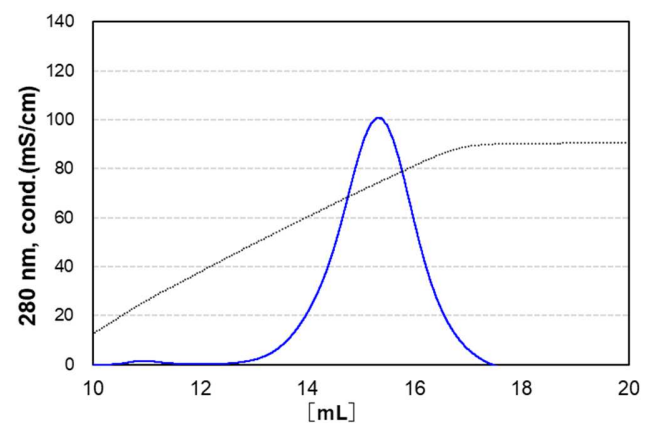
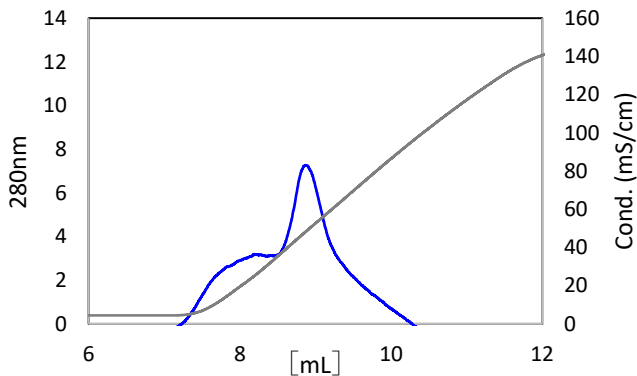
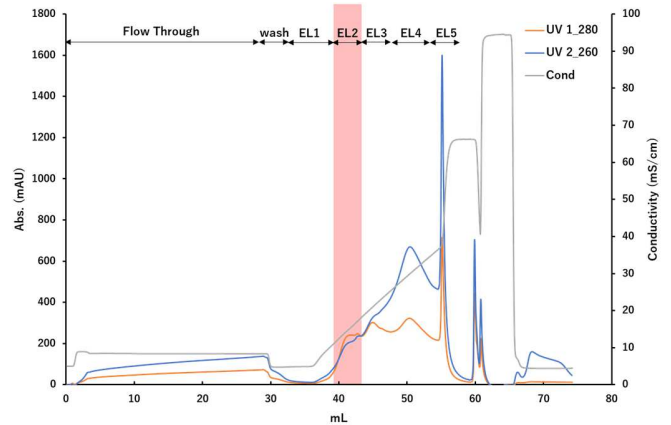


図4 ワクシニアキャッピング酵素の溶出時の電気伝導度



第一ステップとして、弱陰イオン交換クロマトグラフィー充填剤であるセルファイン™MAX DEAEで精製し、酵素活性と不純物挙動を分析した。

図5 MAX DEAE 精製時のクロマトグラム



カラム条件

ロード：硫酸沈殿懸濁液 (10 mS/cm 以下) 0.22µm PVDF シリンジフィルターでろ過

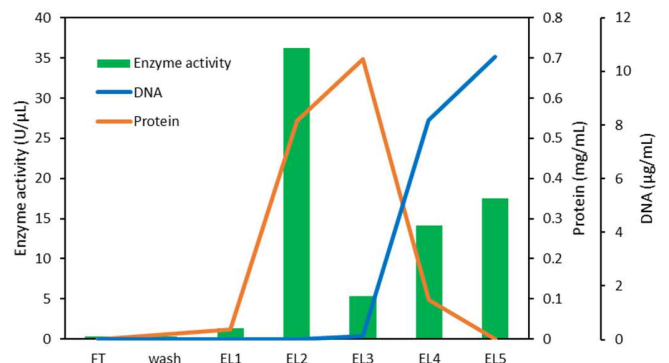
カラム：ID 6.7 mm x 3.0 cm (1.0 mL)

流速：0.5 ml/min (RT 2.0 min)

平衡化：10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10% glycerol, protease inhibitor (+)

溶出：10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.0 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10% glycerol, protease inhibitor (+)

図6 各画分の不純物



FT：フロースルー画分、Wash：洗浄画分、EL1～EL5：グラジエント溶出における溶出画分

T7 RNA ポリメラーゼの精製事例

セルファイン™ フォスフェイト HC と陰イオン交換クロマトグラフィー充填剤であるセルファイン™MAX DEAE を用いて、T7RNAP を高純度に精製することができる。以下に2つのセルファイン™を用いた T7RNAP の精製事例を紹介する。

1. タンパク質発現

まず T7RNAP を発現する組換え大腸菌 (pAR1219) を培養し、IPTG によって T7RNAP 発現を誘導した。遠心分離 (5000 xg, 5 min) によって集菌し、PBS で洗浄した。溶解バッファーでペレットを懸濁後、リゾチームを加えて凍結融解 3 回で溶菌させた。ライセート量に対して硫酸アンモニウムを 35% (w/v) になるよう添加後し、4°C で 60 min 攪拌した。遠心分離 (4°C, 15000 xg, 60 min) して上清を捨て、沈殿を回収した。これらの操作で T7RNAP を含む粗抽出物を準備した。

2. イオン交換クロマトグラフィー

硫酸沈殿に平衡化バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10% glycerol, protease inhibitor (+)) で懸濁し、10 mS/cm 以下に導電率を下げた。

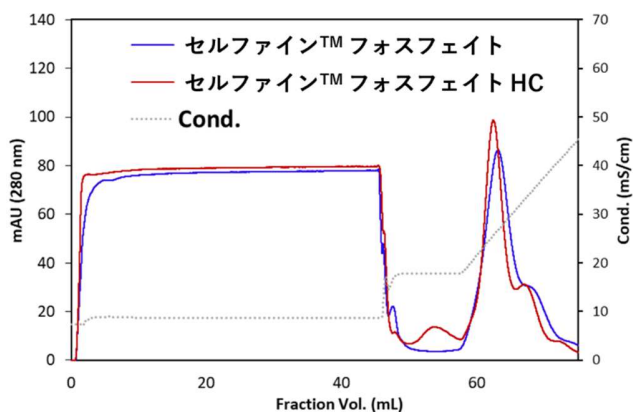
セルファイン™MAX DEAE でクロマトグラフィー精製時のクロマトグラムを示す (図5)。溶出工程ではグラジエントで塩濃度を増加させていった。溶出画分は不純物のプロファイルを確認するために5つに分けてサンプルを回収した (EL1~EL5)。各画分の不純物を分析するために、DNA 量、タンパク質量および酵素活性を測定した。

酵素活性の高い溶出画分 (EL2) と、宿主由来 DNA が多い溶出画分 (EL4~EL5) を分離して、EL2 画分を次のアフィニティークロマトグラフィーでの精製を試みた。

3. アフィニティークロマトグラフィー

セルファイン™MAX DEAE の溶出画分 (EL2 画分) をプールして、平衡化バッファーで約3倍に希釈し、セルファイン™フォスフェイト HC またはセルファイン™フォスフェイトで高純度に精製した (図7)。

図7 フォスフェイトによる高純度精製



カラム条件

カラム: 1.06 mL,

流速: 0.53 mL/min (RT 2 min),

平衡化: 10 mM potassium phosphate pH7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM, EDTA, 0.1 mM DTT, protease inhibitor

溶出: 平衡化バッファー + 1 M NaCl

セルファイン™フォスフェイト HC のクロマトグラフィー後に酵素活性、タンパク質量、DNA 量を測定した (表2)

ロードサンプルと比較して夾雑タンパク質は 32%、DNA 量は 42%まで低下することができた。

表2 フォスフェイト後の純度分析

	酵素活性 (U)	タンパク質 (ng/Unit)	DNA (pg/Unit)
ロードサンプル	-	5.27	1.14
セルファイン™フォスフェイト	626,816	1.53	0.58
セルファイン™フォスフェイト HC	603,621	1.69	0.49

4. 考察

T7RNAP は図8に示すように溶菌・硫酸沈殿を含む前処理工程を経た後、2段階のクロマトグラフィー精製を経ることで高純度に精製することが出来る。各工程の精製度を SDS-PAGE で評価した (図9)。クロマトグラフィーの各工程を経るごとに夾雑物が除かれ、セルファイン™フォスフェイト HC 精製後にはほとんどシングルバンドが得られており、T7RNAP が高純度に精製されたことが分かる。

図8 T7RNAP の精製プロセス概要

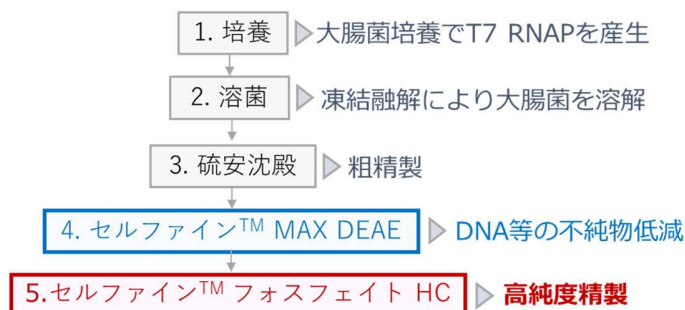
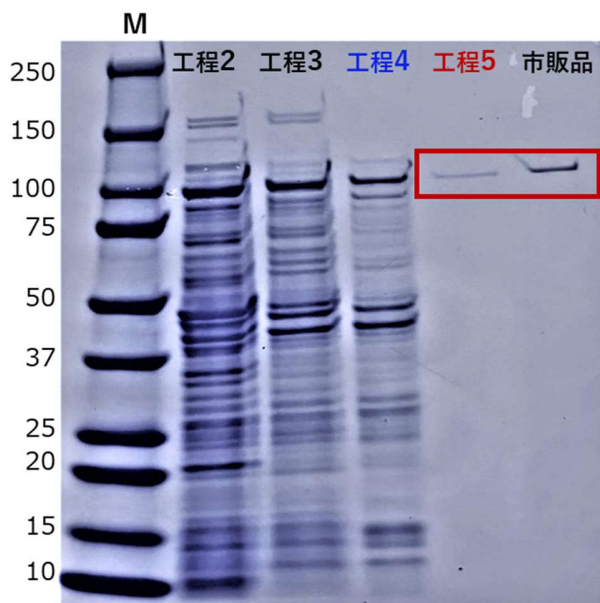


図9 各工程後の T7RNAP の精製度 (SDS-PAGE)



工程 2 : 溶菌後

工程 3 : 硫酸沈殿後

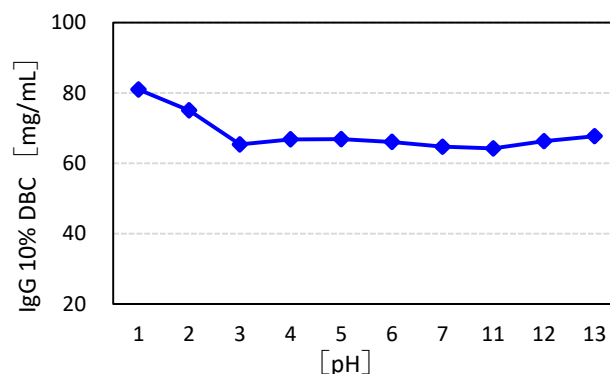
工程 4 : セルファイン™MAX DEAE 精製

工程 5 : セルファイン™フォスフェイト HC 精製

5. 定置洗浄・化学安定性

セルファイン™フォスフェイト HC は幅広い pH で安定的に高い性能を発揮することができる (図 10)。特に pH3 より高いアルカリ性側においては極めて安定である。各 pH に調整したバッファー内で 7 日間、充填剤を浸漬し、その後、動的吸着量を測定した。pH3 よりも低い pH 域では、期待に反して動的吸着量が増加した。リガンドとなるリン酸エステル基は低 pH 域で脱離される。しかしリガンドが適度に脱離した結果、細孔内拡散が意図とは反して向上したことによる。このような低 pH 域ではリガンドの脱離が見られるため使用には十分に注意する必要がある。

図 10 pH 安定性



カラム条件

ロード : IgG

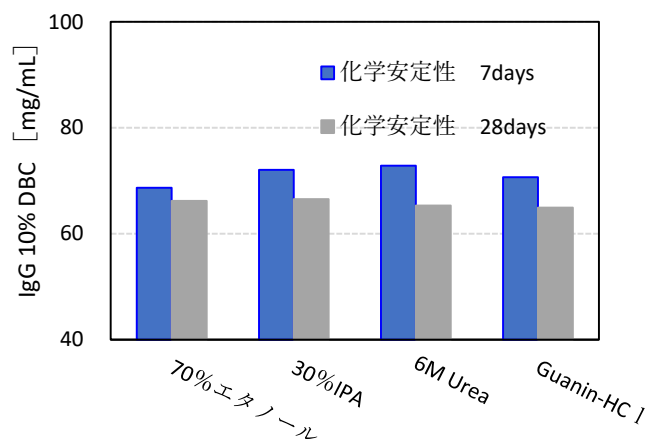
カラム : 1.06 mL,

流速 : 0.265 mL/min (RT 4 min),

浸漬時間 : 7 日間

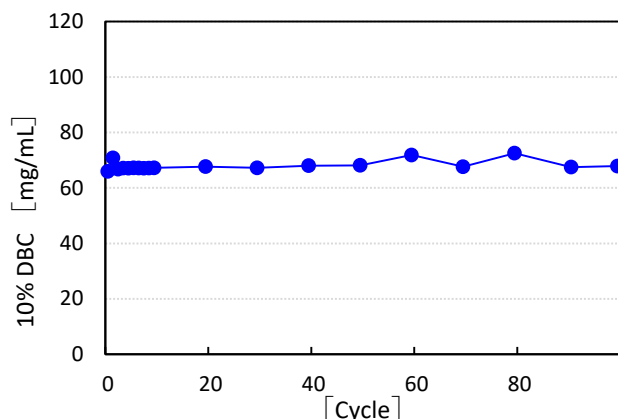
セルファイン™フォスフェイト HC は 70%エタノール、30%IPA、6M Urea、Guanin-HCl 水溶液に対して化学安定性がある (図 11)。

図 11 化学安定性



定置洗浄液として 0.5M NaOH 水溶液を用いた繰り返し試験を実施した (図 12)。100 回の繰り返し試験において動的吸着量に変化は見られないことから安定的に使用できる。

図 1 2 0.5M NaOH での定置洗浄



カラム条件

ロード : IgG

カラム : 1.06 mL,

流速 : 0.265 mL/min (RT 4 min)

CIP : 0.5M NaOH 水溶液

セルファイン™を用いたエンドトキシンの除去

大腸菌を宿主としてタンパク質を生産する場合、宿主由来のエンドトキシンを除去することが好ましい。エンドトキシンの除去には JNC の独自技術であるアフィニティークロマトグラフィー充填剤であるセルファイン™ET クリーンを使用することが有効である。

セルファイン™ET クリーン -生理食塩水の pH、イオン強度（イオン強度 $\mu = 0.02 - 1.0$ 、温度 $0 - 25 ^\circ C$ ）の条件でグラム陰性菌由来のエンドトキシンを除去することができるアフィニティークロマトグラフィー充填剤。

ET クリーン S（細孔の排除限界分子量 2,000 Da、多くのタンパク質は細孔内に入らない）

ET クリーン L（細孔の排除限界分子量 $> 2 \times 10^6$ Da、多くのタンパク質は細孔内に入る）

ご注文の情報

製品名	容量	カタログ No.
セルファイン™ フォスフェイト HC	5 x 1 ml ミニカラム	19400-15
	1 x 5 ml ミニカラム	19400-51
	10 ml	19400
	50 ml	19401
	500 ml	19402
	5 lt	19403
	10 lt	19405

JNC 株式会社

ライフケミカル事業部

東京都千代田区大手町二丁目2番1号

TEL : 03-3243-6150 Fax : 03-3243-6219

e メールアドレス: cellufine@jnc-corp.co.jp

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>